

⑫ 公開特許公報(A) 平4-121186

⑮ Int. Cl.⁵
 C 12 N 9/16
 A 21 D 8/04
 //(C 12 N 9/16
 C 12 R 1:225)

識別記号 Z 庁内整理番号
 7823-4B
 9162-4B

⑬ 公開 平成4年(1992)4月22日

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全7頁)

⑭ 発明の名称 新規エステラーゼ、生産菌及び利用

⑯ 特 願 平2-238974

⑰ 出 願 平2(1990)9月11日

⑱ 発 明 者 小 崎 道 雄 東京都世田谷区上用賀3-7-10
 ⑱ 発 明 者 岡 田 早 苗 東京都府中市幸町2-9-2
 ⑱ 発 明 者 吉 田 巖 埼玉県富士見市関沢3-19-28-402
 ⑱ 発 明 者 豊 田 建 吾 東京都北区堀船1-29-6
 ⑲ 出 願 人 オリエンタル酵母工業 東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号
 株式会社
 ⑲ 出 願 人 日本油脂株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目10番1号
 ⑳ 代 理 人 弁理士 戸 田 親 男

明 細 書

1. 発明の名称

新規エステラーゼ、生産菌及び利用

2. 特許請求の範囲

(1) 下記の理化学的性質を有する新規エステラーゼ。

1. 小麦粉のphospholipids、Iveen80及び1-monooleoyl-rac-glycerolに作用する。

2. 小麦粉のphospholipids、Iveen80及び1-monooleoyl-rac-glycerolに作用し、triolein、1-3-diolein及び小麦粉のnonpolar lipidsに作用しない基質特異性を有する。

3. pH5～8の至適pHを有する。

4. 30～45℃の至適温度を有する。

(2) ラクトバチルス属に属し、請求項第1項の新規エステラーゼを生産する菌もしくはその培養物。

(3) 請求項第1項の新規エステラーゼ、請求項第2項の菌もしくはその培養物を用いて製造したパンもしくは菓子パン。

(4) 請求項第1項の新規エステラーゼ、請求項第

2項の菌もしくはその培養物を用いて中種を製造し、得られた中種を各種原料と混合して生地を製造し、得られた生地を発酵し、焼成することと特徴とするパンもしくは菓子パンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規エステラーゼ、生産菌及びその利用に関するものである。

更に詳細には、本発明は、パンの老化を防止する作用を有する新規エステラーゼとその生産菌及びこれらを用いたパンもしくは菓子パンに関するものである。

本発明の新規エステラーゼ、その生産菌もしくはその培養物を、パンもしくは菓子パンの製造に用いて用いれば、製造されたパンもしくは菓子パンはかなり老化がおくれ、食パンであれば3日～2週間固くなるのが防止されるのである。

従って、本発明はパン業界や菓子パン業界に大いに貢献するものである

(従来技術及び問題点)

一般的に、パンもしくは菓子類等は老化しやすい食品の一つである。しかしながら、近年のパンもしくは菓子の消費者指向としては、いつまでも柔らかくて新鮮な要請が求められている。この老化抑制に対し、いままでモノグリセライド等の食品添加物で対応していたが、最近の天然物志向に合致していないという問題点がある。

一方、伝統的な製パン法において、パン種として使われているサンフランシスコサワーやパネトーネサワーを用いれば、常法でも長時間柔らかなパンができることは知られており、それらサワードウ中の乳酸菌がその効果に関与しているといわれている。このことは最近の研究で明かにされている。

しかしながら、サンフランシスコサワーやパネトーネサワーのパン種菌の系統的管理は難しく、また原料や製パン工程の管理、例えば温度、発酵時間により大きく影響をうけ、長時間柔らかなパン、そして品質の安定したパンが得られにくいと

命名されているが、この酵素をパン生地調製時に使用すれば、この酵素が脂質に作用して生成した分解物がパンの長時間にわたる柔軟性保持に役立つものと考えられるに至っている。

本発明のエステラーゼTNの理化学的性質の詳細は次の通りである。

1. 小麦粉のphospholipids、Iween80及び1-monooleoyl-rac-glycerolに作用する。

2. 小麦粉のphospholipids、Iween80及び1-monooleoyl-rac-glycerolに作用し、triolein、1-3-diolein及び小麦粉の nonpolar lipidsに作用しない基質特異性を有する。

種々の基質に対するエステラーゼ活性の比較は次の表1に示される。

いう欠点があった。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、パンを長時間柔らかく保つ技術を、サンフランシスコやパネトーネなどの地域に限定されることなく、どこでも利用できるように鋭意研究したところ、本発明においてパンを長時間柔らかく保つことのできる酵素を明らかにし、パンを長時間柔らかく保つパン製造技術を確立することに成功したのである。

即ち、本発明は下記の理化学的性質を有する新規エステラーゼに関する。

1. 小麦粉のphospholipids、Iween80及び1-monooleoyl-rac-glycerolに作用する。
 2. 小麦粉のphospholipids、Iween80及び1-monooleoyl-rac-glycerolに作用し、triolein、1-3-diolein及び小麦粉の nonpolar lipidsに作用しない基質特異性を有する。
 3. pH5～8の至適pHを有する。
 4. 30～45℃の至適温度を有する。
- 本発明の新規エステラーゼはエステラーゼTNと

表 1

基 質	相対活性(%)
Iween80	100
(Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate)	
Triolein	0
1,3-Diolein	0
1-Monooleoyl-rac-Glycerol	65
Nonpolar lipids (小麦粉)	0
Phospholipids (小麦粉)	150

3. pH5～8の至適pHを有する。

エステラーゼ活性に及ぼすpHの影響は、広域バッファーである BrittonとRobinsonのバッファーを用いて4.0から10.0までの間で測定した。基質には各pHのバッファーに溶解した0.1mg/mlのBSAを含む1.5% Iween80を使用し、37℃で30分間反応させた。

その結果は第1図に示す通りである。

4. 30～45℃の至適温度を有する。

20℃から55℃の間で酵素活性を測定した。その

他の条件は至適pHの測定と同じように行なった。

その結果は第2図に示す通りである。

5. エステラーゼINの製造

ラクトバチルス クルバタス (*Lactobacillus curvatus*) IN-8 NRIC 1716 (FERM P-11682) を GYP 培地 (500ppm の Tween80 と 1% の 酢酸ソーダ を含む) で 30℃、24時間培養した。

培養液を 6000rpm で 15分遠心分離し、菌体を得。これを 2mM CaCl_2 を含む pH7.0 の 50mM

β -glycerophosphate buffer で 2回洗浄し、6000rpm で 15分間遠心分離し、得られた菌体を pH 7.8 の 50mM Iris-HCl buffer の 200mL 中に懸濁させ、30℃で 2時間インキュベートし、1800rpm で 30分遠心分離し、沈澱物を除去し、エステラーゼIN抽出液を得た。

6. 酵素活性の測定

菌体懸濁液と精製酵素: 0.1mg/mL の BSA を含む 1.5% の Tween80 (50mM リン酸バッファー、pH7.0) 溶液を基質として 37℃で 30分間反応させた。懸濁液の場合は反応液を遠心分離 (15000rpm × 3min.)

DEAE-Sephacel による CVE のイオン交換クロマトグラフィーは第4図に示される。

疎水クロマトグラフィー: 0.5M の 硬安 (50mM トリス塩酸バッファー、pH7.8) で平衡化した プチルトヨパール 650M のカラム (1.5 × 15cm) に 0.5M 硬安濃度のイオン交換クロマトグラフィー活性成分を 1mL/min の流速でアプライした。280nm の吸光度が 0.05 以下になるまで 0.5M の 硬安 で洗浄したのち、0.5M から 0M 硬安 の リニアージラジェント (400mL) で溶出した。

プチルトヨパールを用いた疎水クロマトグラフィーによる エステラーゼIN の精製は第5図に示される。

8. 分子量

SDS-PAGE: 疎水クロマトグラフィーより得られた活性成分を pH7.0 の 50mM リン酸バッファーと遠心限外濾過チューブ (ザルトリウス社製) で脱塩、濃縮したものを泳動用試料とした。7.5% ポリアクリルアミドゲルのミニスラブ電気泳動装置 (アトー社製) を使用し、Laemmli の方法 (5) に準拠し

し、上清液のオレイン酸量を遊離脂肪酸測定キット (和光純薬) で測定した (10% 懸濁液 50 μ L - 基質 2mL)。CVE と分画チューブ: 0.2mg/mL の BSA を含む 3.0% の Tween80 溶液を基質として 37℃で 4時間反応後、同様に測定した (試料 1mL - 基質 1mL)。

L. curvatus IN-8 株のインタクトセルによる Tween80 の分解曲線は第3図に示される。

本酵素では Tween80 を分解し、1分間に 1 μ mol のオレイン酸を生成する酵素量を 1単位とした。

7. 酵素の精製

イオン交換クロマトグラフィー: pH7.8 の 50mM トリス塩酸バッファーで平衡化した DEAE-Sephacel カラム (2.5 × 20cm) に CVE を 2mL/min の流速でアプライした。CVE をアプライ後、トリス塩酸バッファーで洗浄した。非吸着の吸光度が低下したのちに 2mL/min の流速で 5mL ずつ分画し 0 から 0.3M NaCl (50mM の トリス塩酸バッファー、pH7.8) の リニアージラジェント (500mL) で溶出した。酵素活性の画分は集めた後、0.6M の 硬安濃度に濃縮した。ピークは 280nm の吸光度で検出した。

で行なった。分子量マーカーはベーリンガー社製を用いた。タンパクはクマシーブリリアントブルー G250 で染色した。

精製された エステラーゼIN の SDS-PAGE は第6図に示される。

エステラーゼIN の分子量は 8400 であった。

本発明は、ラクトバチルス属に属し、請求項第1項の エステラーゼIN を生産する菌を包含している。

エステラーゼIN 生産菌の具体例としては、サワー種から分離されたラクトバチルス クルバタス (*Lactobacillus curvatus*) IN-8 NRIC 1716 (FERM P-11682) があげられる。

ラクトバチルス クルバタス IN-8 の菌学的性質は次の通りである。

性 質

形 態	rods
グラム染色	+
カタラーゼ	-
15℃の生育	+

45℃の生育

最適pH

6.0~7.5

発酵のタイプ

homo

乳酸の光学形態

DL

糖の発酵性

L-arabinose

-

D-ribose

-

D-xylose

-

glucose

+

fructose

+

galactose

+

mannose

+

rhamnose

-

maltose

+

cellobiose

-

lactose

+

melibiose

-

sucrose

-

trehalose

+

uracil

-

xanthine

-

ラクトバチルス クルパタスIN-8はGYP培地(500ppmのIveen80と1%の酢酸ソーダを含む)で30℃、24時間程度培養することによって単一面の培養物を得ることができる。

GYP培地組成は次の通りである。

glucose	20g
yeast extract	10g
peptone	10g
Na-acetate-3H ₂ O	10g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200mg
MgSO ₄ ·4H ₂ O	10mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10mg
NaCl	10mg
water	1000ml

pH6.5

本発明においては、エステラーゼIN、エステラーゼIN生産菌もしくはその培養物を用いてパンもしくは菓子パンを製造し、長時間柔軟性を保持す

salicin

+

raffinose

-

sorbitol

-

mannitol

-

gluconate

-

starch

-

melizitose

-

ビタミンと塩基の要求性

thiamine

-

riboflavin

+

biotin

-

niacin

+

PABA

-

Ca-pantothenate

+

folic acid

+

pyridoxal

-

pyridoxine

-

adenine

-

guanine

-

るパンもしくは菓子パンを得ることができるものである。

エステラーゼIN、エステラーゼIN生産菌もしくはその培養物を用いて中種を製造し、得られた中種を各種原料と混合して生地を製造し、得られた生地を発酵し、焼成することによってパンもしくは菓子パンを製造することができる。

次に本発明の実施例を示す。

実施例1

ラクトバチルス クルパタス (Lactobacillus curvatus)IN-8 NRIC 1716(FERM P-11682)をGYP培地(500ppmのIveen80と1%の酢酸ソーダを含む)で30℃、24時間培養した。

培養液を6000rpmで15分遠心分離し、ラクトバチルス クルパタスIN-8の培養物を得た。

実施例2

大豆レシチン10gとサラダ油10gを混合、加熱溶解し、水80gを加えてホモミキサーで混合し、乳化液とした。

この乳化液100mlに実施例1で得た培養物の10

%懸濁液10mlに添加し、30℃で3日間攪拌インキュベートし、インキュベート処理物を得た。

このインキュベート処理物は、そのまま生菌体を含んでいてもよく、また、殺菌してもいずれでもパンもしくは菓子パンの製造に使用することができる。

実施例3

実施例2で得たインキュベート処理物(生菌体含有)5g、小麦粉100g、水38.5g、フード0.1g、パン酵母2gをよく混合し、28℃で4時間置き、中種とした。

この中種にショートニング4g、食塩2g、砂糖4g、小麦粉70g、水65gを加え、よく混合し、ドウとした。

このドウはフロアタイム15分とり、分割し、ベンチタイム17分とり、成型し、ケースに入れて、ホイロで37℃で55分置き、次いで220℃で40分焼成し、食パン得た。

通常食パンは冷蔵庫に入れても2～3日で固くなるがこの食パンは5日間は柔軟性を保持してい

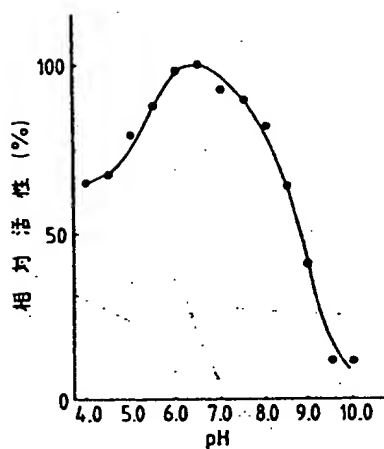
た。

4. 図面の簡単な説明

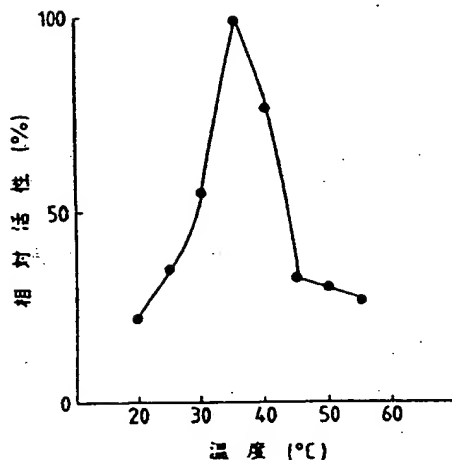
第1図はエステラーゼTNの至適pHを示す図で、第2図はその至適温度を示す図で、第3図はインタクトセルによるIveen80の分解を示す図で、第4図はDEAE-SephacelによるCVEのイオン交換クロマトグラフィーを示す図で、第5図はブチルトヨパールを用いた疎水クロマトグラフィーによるエステラーゼTNの精製を示す図で、第6図は精製されたエステラーゼTNのSDS-PAGEを示す図である。

代理人 弁理士 戸田 親 男

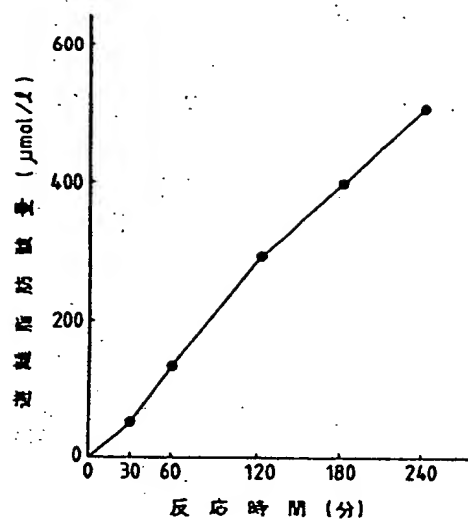
第 1 図



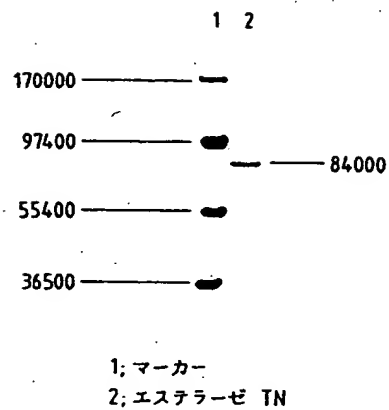
第 2 図



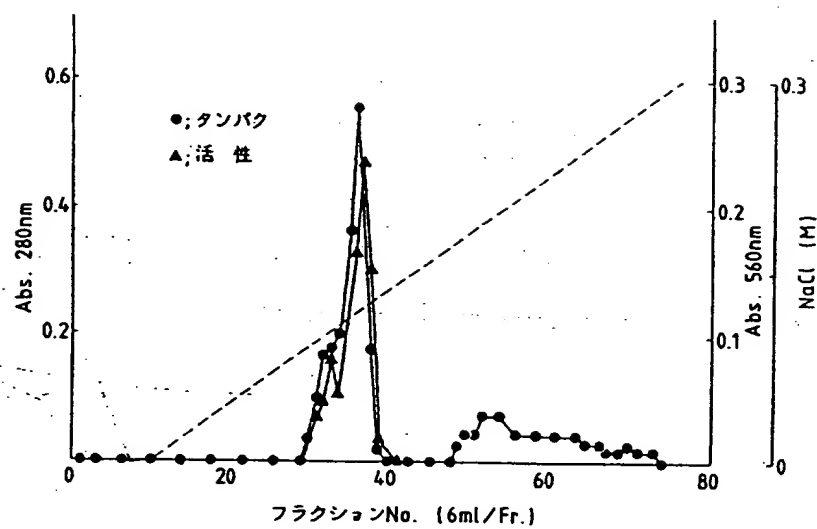
第 3 図



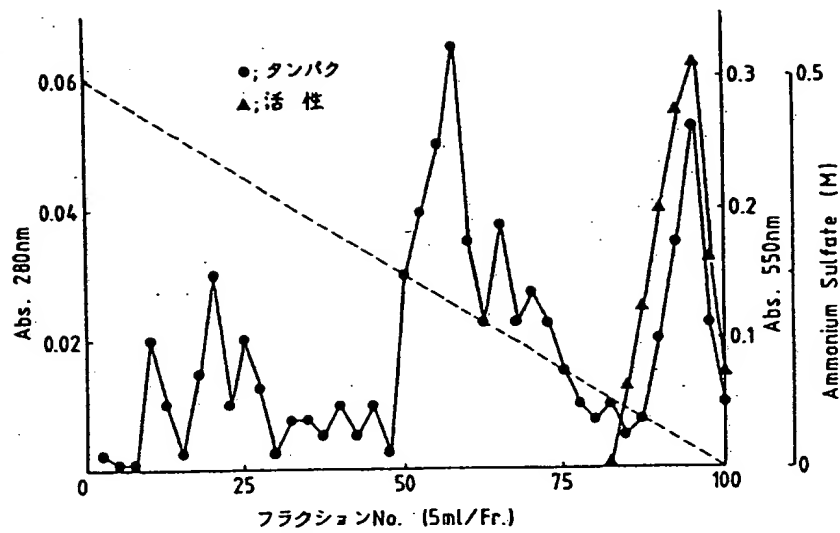
第 6 図



第 4 図



第 5 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.